

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09014

研究課題名(和文) パーシカンの血管内皮グリコカリックスにおける機能の解析

研究課題名(英文) Versican in Endothelial Glycocalyx

研究代表者

長屋 聡一郎 (Nagaya, Soichiro)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60444311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞の内腔面を覆っている血管内皮グリコカリックスの成分の1つである可溶性プロテオグリカンのパーシカンの詳細な機能はいまだ不明である。本研究ではパーシカンの機能を、血管内皮特異的にパーシカンをノックアウトしたマウスを用いて、その機能について検討を行った。9-12週齢の雄性マウスを用いて脳や心臓、肺、肝臓、腎臓、腸管において組織学的解析を行ったところ、特にPhenotypeを認めないが、血管内皮グリコカリックスの構造の菲薄化を確認した。このマウスにリポ多糖を腹腔内投与したところ、生存率を確認したところ生存率には有意な差を認めなかったが、肺で炎症細胞の浸潤が有意に増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はグリコカリックスの構成成分であるVcanを血管内皮特異的にノックアウトする手法を用いて検討を行うことで、血管内皮グリコカリックスと炎症の直接的な関連を調べることができると、糖尿病をはじめとする血管内皮障害を引き起こすと考えられる生活習慣病に対する治療を新規に構築していくうえでも必要な情報を得られるため、本研究は社会的意義の大きい研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The detailed function of versican, a soluble proteoglycan that is one of the components of the vascular endothelial glycocalyx lining the luminal surface of vascular endothelial cells, is still unknown. In this study, the function of versican was examined in mice in which versican was knocked out specifically in the vascular endothelium. 9- to 12-week-old male mice were used for histological analysis in the brain, heart, lung, liver, kidney, and intestinal tract, although no specific phenotypes were observed. We observed thinning of the structure of the vascular endothelial glycocalyx. Intraperitoneal administration of lipopolysaccharide to these mice showed no significant difference in survival when survival was checked, but inflammatory cell infiltration was significantly increased in the lungs.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：血管内皮グリコカリックス 急性炎症 パーシカン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

身体を構成する様々な細胞の生命活動は身体の隅々まで張り巡らされる大小の血管網により供給される酸素や栄養により維持されている。血管内皮の表面はプロテオグリカンや糖タンパク質などにより構成されるグリコカリックスに覆われており血管の恒常性が維持されている。血管内皮グリコカリックスの主成分であるプロテオグリカンはグリコカリックスの骨格として機能している。

プロテオグリカンはコアタンパクに 1 つ以上のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖が結合した分子でコアタンパクのサイズ、結合した GAG 鎖の数、および細胞膜に結合しているかどうかに関して各々違いがある。例えばシンデカンやグリピカンは細胞膜に強固に結合している一方で、パーレカンやバーシカン (Vcan)、デコリン、パイグリカンなどは可溶性プロテオグリカンとして分泌される。

血管系においてヘパラン硫酸プロテオグリカンはグリコカリックス中プロテオグリカン総量の約 50~90%を占める一方で、2 番目に多い GAG 鎖はコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸であり、この GAG 鎖に結合するプロテオグリカンの 1 つに Vcan がある。しかし、血管内皮上に存在する Vcan の機能についてはいまだ不明な部分が多い。

この理由としてグリコカリックスは血管内膜との結合部は絶えず Turnover を繰り返しており局所での内皮由来分子と取り込まれた血漿由来分子との間に明確な境界がなく現在の可視技術では内皮から血管内腔に向かってのグリコカリックス内の明確な組成の違いを示すことはできないからである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は血管内皮グリコカリックスと炎症細胞動態の関連について以下の 3 つに分けて行うことである。

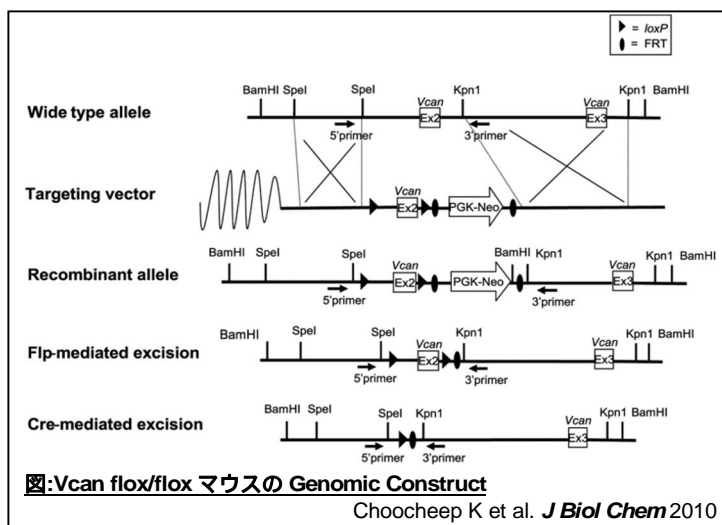
- A) 血管内皮特異的Vcan KOマウスの各臓器における表現型の検討
- B) 血管内皮特異的Vcan KOマウスの血管内皮グリコカリックスの解析
- C) 血管炎誘発下での血管内皮特異的Vcan KOマウス表現型の検討

### 3. 研究の方法

#### A) 血管内皮特異的Vcan KOマウスの各臓器における表現型の検討

本研究ではまずグリコカリックスの構成成分のひとつである Vcan を血管内皮特異的に KO したマウスを用いる(図)。

9-12 週齢の雄性マウスを用いて脳や心臓、肺、肝臓、腎臓、腸管において解析を行う。また、Vcan KO によって他のプロテオグリカンの発現パターンについても免疫組織学的に局在を確認する。



## **B) 血管内皮特異的 Vcan KO マウスの血管内皮グリコカリックスの解析**

血管内皮グリコカリックスの超微形態の観察はマウスの Sacrifice 時に、グルタールアルデヒドと硝酸ランタンを含んだカコジル酸バッファーを 100mmHg の圧で左心室心尖部より注入し 5 分間還流固定を行う。還流固定後素早く臓器を取り出し、さらに 2 時間還流液に浸した後、グルタールを除去したカコジル酸バッファーに置換しさらに一晩浸す。翌日アルカリ性の洗浄液で洗浄後カコジル酸バッファーに浸す。このようにして得たサンプルを、液体窒素による凍結切断法を用いて走査型電子顕微鏡用のサンプルを作製する。また、同様にして作成したサンプルを脱水しエポキシ樹脂に埋め込み透過型電子顕微鏡用のサンプルとして使用する。

## **C) 血管炎誘発下での血管内皮特異的 Vcan KO マウス表現型の検討**

9-12 週齢の上記マウスに対してリポ多糖 (LPS) 15mg/kg を腹腔内投与して血管炎モデルマウスを作成して上記と同様の解析を行う。

## 4. 研究成果

### **A) 血管内皮特異的 Vcan KO マウスの各臓器における表現型の検討**

9-12 週齢の雄性マウスを用いて血管内皮特異的 Vcan KO マウスの表現型の検討を行った。HE 染色を用いて脳や心臓、肺、肝臓、腎臓、腸管において組織学的解析を行ったところ、特に Phenotype を認めなかった。

### **B) 血管内皮特異的 Vcan KO マウスの血管内皮グリコカリックスの解析**

トマトレクチンを用いて血管内皮グリコカリックスの定量を Intensity Score を用いて検討したところ、いくつかの臓器で KO マウスにおいて血管内皮グリコカリックスが減少していることが確認された。走査型電子顕微鏡を用いて血管内皮グリコカリックスを評価したところ、部分的な脱落ではなくグリコカリックス層が全体的に菲薄化していることが確認された。一方で臓器によっては血管内皮グリコカリックスが全く菲薄化していない部位も確認された。

### **C) 血管炎誘発下での血管内皮特異的 Vcan KO マウス表現型の検討**

LPS15mg/kg を腹腔内投与して 48 時間後の生存率を比較したところ、生存率に有意な差は認めなかった。肺において、LPS 投与後 48 時間での血管内皮グリコカリックスの超微形態を比較したところ野生型マウスと KO マウスともに正常時に比べてグリコカリックスの脱落が認められ、特に KO マウスではグリコカリックスの障害が大きく、血管内皮表面がほぼ血管内腔に露出していた。

また炎症細胞の浸潤について CD11b による免疫染色を用いて比較検討したところ、KO マウスにおいて炎症細胞の浸潤が有意に増加していることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshimura Genki, Kamidani Ryo, Yasuda Ryu, Miura Tomotaka, Yamaji Fuminori, Mizuno Yosuke, Kitagawa Yuichiro, Fukuta Tetsuya, Ishihara Takuma, Suzuki Kodai, Miyake Takahito, Nagaya Soichiro et al.	4. 巻 54
2. 論文標題 Clinical characteristics of patients with snow sports trauma transported to a trauma care center: A retrospective observational study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Injury	6. 最初と最後の頁 1379 ~ 1385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.injury.2022.12.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kusuzawa Keigo, Suzuki Keiko, Okada Hideshi, Suzuki Kodai, Takada Chihiro, Nagaya Soichiro et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Measuring the Concentration of Serum Syndecan-1 to Assess Vascular Endothelial Glycocalyx Injury During Hemodialysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 791309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2021.791309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上谷遼、吉田省造、南山徹、安田立、北川雄一郎、三宅喬人、長屋聡一郎、土井智章、岡田英志、小倉真治
2. 発表標題 持続勃起症で判明した慢性骨髄性白血病に白血球除去療法が奏功した一例
3. 学会等名 第67回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土井智章、吉田省造、楠澤佳悟、安田立、北川雄一郎、長屋聡一郎、岡田英志、小倉真治、山田徹
2. 発表標題 救急医と透析医の二刀流への挑戦は成功するのか？
3. 学会等名 第67回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	吉田省造、上谷遼、安田立、北川雄一郎、長屋聡一郎、土井智章、岡田英志、楠澤佳悟、大岩秀明、小倉真治
2. 発表標題	急性肺炎で入院後次々発症する複数の疾患加療中に敗血症性ショックを合併しPMX-DHPを含む急性血液浄化療法が有効だった一例
3. 学会等名	第67回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	上谷遼、安田立、岡本遥、長屋聡一郎、岡田英志、小倉真治
2. 発表標題	小児鈍的腹部外傷の特徴とその治療戦略に関する検討
3. 学会等名	第35回日本小児救急医学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	上谷遼、吉田省造、北川雄一郎、福田哲也、三宅喬人、長屋聡一郎、土井智章、岡田英志、小倉真治
2. 発表標題	当院でのCOVID-19蔓延下における急性血液浄化療法の現況と取り組み
3. 学会等名	第33回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	大岩秀明、吉田省造、岡田英志、土井智章、長屋聡一郎、三宅喬人、岡本遥、上谷遼、多田真、小倉真治
2. 発表標題	当救命救急センターにおける熱傷症例の検討と虐待を疑う症例に対する対応
3. 学会等名	第50回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 土井智章、吉田省造、岡田英志、長屋聡一郎、北川雄一郎、安田立、鈴木浩大、小倉真治、土屋朋大、坪内俊之、渡邊崇量、石原丈士、吉田学郎、内藤順子、大野夢乃、野老山茂寛、山田徹
2. 発表標題 ビルシカイニド中毒に対しての急性血液浄化療法を考察する
3. 学会等名 第66回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田英志、楠澤佳悟、北川雄一郎、長屋聡一郎、土井智章、吉田省造、小倉真治、鈴木景子、鈴木昭夫
2. 発表標題 血液浄化療法により生じる血管内皮グリコカリックス障害の定量
3. 学会等名 第66回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田省造、吉村絃希、安田立、土井智章、岡田英志、北川雄一郎、長屋聡一郎、小倉真治
2. 発表標題 維持透析患者新型コロナウイルス感染症発症時の治療課題
3. 学会等名 第66回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土井智章、吉田省造、楠澤佳悟、安田立、北川雄一郎、長屋聡一郎、岡田英志、小倉真治
2. 発表標題 当院における重症熱傷に対する急性血液浄化療法の検討
3. 学会等名 第32回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村絃希、北川雄一郎、吉田省造、上谷遼、楠澤佳悟、柿野圭紀、三浦智孝、大岩秀明、安田立、岡本遥、長屋聡一郎、土井智章、岡田英志、柚原利至、小倉真治
2. 発表標題 自殺のため市販薬である無水カフェイン製剤を大量内服し急性血液浄化療法を実施した13歳女性の一例
3. 学会等名 第32回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名知祥、山田法顕、北川雄一郎、大岩秀明、山路文範、安田立、福田哲也、三宅喬人、館正仁、橋本孝治、土井智章、長屋聡一郎、吉田隆浩、熊田恵介、小倉真治
2. 発表標題 岐阜県ドクターヘリ10年の現状と課題
3. 学会等名 第28回日本航空医療学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北川雄一郎、名知祥、三浦智孝、山路文範、安田立、福田哲也、三宅喬人、館正仁、長屋聡一郎、土井智章、吉田隆浩、小倉真治
2. 発表標題 岐阜県の航空機搬送 ドクターヘリと防災ヘリ
3. 学会等名 岐阜県の航空機搬送 ドクターヘリと防災ヘリ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土井智章、吉田省造、大岩秀明、水野洋佑、北川雄一郎、安田立、三宅喬人、長屋聡一郎、熊田恵介、小倉真治
2. 発表標題 吉田省造、大岩秀明、水野洋佑、北川雄一郎、安田立、三宅喬人、長屋聡一郎、熊田恵介、小倉真治
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西尾紋音、岡田英志、楠澤佳悟、鈴木景子、石原拓磨、岡本遥、長屋聡一郎、安田立、鈴木昭夫、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 血液浄化療法により生じる血管内皮障害グリコカリックス障害の定量とその要因解析
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡田 英志  (Okada Hideshi)  (30402176)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授   (13701)	
研究分担者	富田 弘之  (Tomita Hiroyuki)  (50509510)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授   (13701)	
研究分担者	鈴木 昭夫  (Suzuki Akio)  (80775148)	岐阜大学・医学部附属病院・准教授   (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------